

1/7/1
DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011647228

WPI Acc No: 98-064136/199807

Expressing heterologous DNA in ciliate cells - which are efficiently transformed by microparticle bombardment and can provide high yields of proteins when cultured in same way as prokaryotes

Patent Assignee: HOECHST AG (FARH)

Inventor: KIY T; STEINBRUECK G

Number of Countries: 020 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No Kind Date Applicat No Kind Date Main IPC Week

DE 19626564 A1 19980108 DE 1026564 A 19960703 C12N-015/85 199807 B

WO 9801572 A1 19980115 WO 97EP3472 A 19970702 C12N-015/79 199809

EP 847444 A1 19980617 EP 97930486 A 19970702 C12N-015/79 199828

WO 97EP3472 A 19970702

Priority Applications (No Type Date): DE 1026564 A 19960703

Patent Details:

Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent

DE 19626564 A1 5

WO 9801572 A1 G 20

Designated States (National): JP US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC
NL PT SE

EP 847444 A1 G Based on WO 9801572

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
NL PT SE

Abstract (Basic): DE 19626564 A

In the expression of heterologous DNA (I), the new feature is that transformed ciliate cells (A) are used as hosts.

Also claimed are (A) transformed with (I).

USE - Transformed (A) are used to produce proteins.

ADVANTAGE - Ciliates have almost all the characteristics typical of eukaryotes but can be cultured in the same way as prokaryotes (production of genetically identical clones by vegetative replication and rapid development to very high cell densities in continuous or batch cultures).

All genes in their somatic macro-nuclei are strongly amplified, leading to a high expression rate under normal conditions.

(A) can be efficiently transformed by microparticle bombardment; other methods of transformation are inefficient, probably because of the complex and stable cortex structure of the cells.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04; C06; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/79; C12N-015/85

International Patent Class (Additional): C12N-001/11; C12N-015/87

?



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/79, 15/87, 1/11	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/01572 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Januar 1998 (15.01.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03472 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 1997 (02.07.97) (30) Prioritätsdaten: 196 26 564.9 3. Juli 1996 (03.07.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Brünigstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STEINBRÜCK, Günther [DE/DE]; Klopstockweg 5, D-72108 Rottenburg (DE). KIY, Thomas [DE/DE]; Loreleistrasse 14, D-65929 Frankfurt am Main (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: GENETIC TRANSFORMATION OF CILIATE CELLS THROUGH MICROCARRIER BOMBARDMENT WITH DNA-LOADED GOLD PARTICLES (54) Bezeichnung: GENETISCHE TRANSFORMATION VON CILIATENZELLEN DURCH MICROCARRIER- BOMBARDEMENT MIT DNA-BELADENEN GOLDPARTIKELN (57) Abstract The present invention concerns a method for the expression of a heterologous DNA in ciliates. Ciliate cells can be successfully transformed using the microcarrier bombardment method with DNA-loaded gold particles. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Expression einer heterologen DNA in Ciliaten. Mittels der Methode des Microcarrier-Bombardements mit DNA-beladenen Goldpartikeln lassen sich Ciliatenzellen erfolgreich transformieren.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

Genetische Transformation von Ciliatenzellen durch Microcarrier-Bombardement mit DNA beladenen Goldpartikeln

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Expression einer heterologen DNA in einem neuen Expressionssystem bzw. Wirt.

Ciliaten sind einzellige, tierische Eukaryonten. Sie besitzen fast alle typischen Eigenschaften eukaryontischer Zellen und bieten gleichzeitig den Vorteil, daß sie ähnlich wie Prokaryonten kultiviert werden können. Das bedeutet, daß man genetisch identische Klone ausgehend von einzelnen Zellen durch vegetative Vermehrung heranziehen kann. Dabei sind bei einigen Arten sehr hohe Zelldichten in kontinuierlicher oder Batch-Kultur erzielbar. Zudem können sich Ciliaten wie die meisten Eukaryonten sexuell fortpflanzen. Die sexuelle Fortpflanzung, bei den Ciliaten Konjugation genannt, kann man induzieren, indem man Zellen unterschiedlichen Paarungstyps (Paarungstypen sind "multiple Geschlechter") unter geeigneten Bedingungen zusammenbringt. Diese Eigenschaft bietet den Vorteil, daß man Ciliaten wie höhere Eukaryonten kreuzen kann und dadurch z.B. Stämme erzeugen kann, die für ausgewählte Merkmale homozygot sind.

Zusätzlich zu den für die meisten Eukaryonten typischen Merkmalen besitzen Ciliaten eine Anzahl von strukturellen und funktionellen Besonderheiten, die sie sowohl für die zellbiologische Grundlagenforschung als auch für biotechnologische Anwendungen besonders geeignet machen. So findet man in fast allen Ciliatenzellen zwei unterschiedlich differenzierte Typen von Zellkernen: kleine, transkriptionsinaktive, meist diploide Mikronuclei und meist sehr große, DNA-reiche Makronuclei. Die Mikronuclei haben hauptsächlich generative Funktionen, das heißt, im Verlauf der Konjugation entstehen aus ihnen durch Meiose haploide Gametenkerne. Die Gametenkerne von zwei Konjugationspartnern können zu Zygotenkernen verschmelzen und eine neue Zellgeneration mit genetisch rekombinierten Mikronucleusgenomen entstehen lassen. Aus den Zygotenkernen

2

der neuen Generation gehen durch Teilung durch neue Makronuclei hervor. Die Makronuclei steuern alle somatischen Vorgänge der Zellen. Ihr Genom wird permanent transkribiert. Im Verlauf der Makronucleusentwicklung laufen vielfach drastische Eliminations- und Reorganisationsvorgänge im Genom ab. Bei einigen Arten werden bis zu 98 % des Mikronucleusgenoms eliminiert, intervenierende Sequenzen werden aus Genen herausgeschnitten und codierende Regionen können völlig neu rearrangiert werden ("gene scrambling"). Bei allen daraufhin untersuchten Ciliaten liegen die Gene im Makronucleus mehr oder weniger stark amplifiziert vor. Die Kopienzahlen können je nach betrachtetem Gen und Ciliatenart bis zu mehreren Millionen betragen.

Die molekularbiologischen Besonderheiten der Ciliatengenome haben in der jüngsten Vergangenheit zu einigen aufsehenerregenden Entdeckungen geführt. So wurden z.B. die selbst-spleißenden Introns (Ribozyme) zuerst in hochamplifizierten Ciliatengenomen gefunden (Cech, T.R., B.L. Bass (1986): Ann. Rev. Biochem. 55, 599-629). Ebenso wurde die Struktur von Telomeren, den Endstrukturen linearer DNA-Moleküle und der sie synthetisierenden Telomerasen zuerst bei Ciliaten aufgeklärt (Blackburn, E.H. (1991): Nature 350, 569-573). Es zeigte sich später, daß diese grundlegenden Vorgänge und Strukturen, die aufgrund der besonderen Genomstruktur zunächst bei Ciliaten entdeckt wurden, auch für fast alle anderen Eukaryonten charakteristisch sind, dort nur viel schwerer zu entdecken und zu untersuchen sind.

Die skizzierten Besonderheiten der Ciliaten lassen ihre Verwendung auch für biotechnologische Zwecke besonders lohnend erscheinen. Kurz zusammengefaßt stützen die folgenden Gründe diese Annahme:

1. Ciliaten sind einzellige Eukaryonten, die sich in klonalen Kulturen wie prokaryontische Mikroorganismen in hoher Zelldichte bei relativ kurzen Generationszeiten heranziehen lassen.

2. Ihre Zellen weisen fast alle eukaryontischen Eigenschaften auf, die Prokaryonten fehlen, z.B. im Bereich der DNA-Replikation, der Transkription und des Processings, der Translation, der Cytoskelett- und Membranstrukturen, der Endo- und Exocytosevorgänge u.a..
3. Da Ciliaten hochentwickelte, spät vom gemeinsamen Stammbaum abzweigende Eukaryonten sind, weisen ihre Enzyme, Struktur- und Membranproteine sowie ihre Stoffwechselwege viel höhere Ähnlichkeit mit den entsprechenden Strukturen und Vorgängen bei vielzelligen Eukaryonten (z.B. Mensch) auf als das bei vergleichbaren Strukturen und Vorgängen von Prokaryonten (Bakterien) der Fall ist, sofern homologe Elemente dort überhaupt vorkommen.
4. In den somatischen Makronucleusgenomen der meisten Ciliatenarten liegen alle Gene mehr oder weniger stark amplifiziert vor, was zu einer hohen Expressionsrate schon unter normalen Bedingungen führt. Der Grad der Amplifikation mancher Gene kann durch geeignete Maßnahmen erhöht werden.

Das biotechnologische Potential, das die Ciliaten für die Gewinnung zelleigener oder heterologer Produkte bieten können, ist bisher noch kaum erkannt und Versuche zu seiner Nutzung sind noch in der Labortestphase. Erste, erfolgsversprechende Ansätze zur Produktion und Gewinnung zelleigener Stoffe aus Ciliaten in größerem Maßstab wurden erst vor kurzem publiziert (Kiy, T., A. Tiedtke (1991): Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 14-18; Kiy, T., G. Scheidgen-Kleybold, A. Tiedtke (1996): Enzyme and Microbial Technology 18, 268-274).

Die Expression heterologer Gene oder modifizierter, arteigener Gene scheiterte bisher hauptsächlich daran, daß die üblichen Methoden, die zur Transformation von Eukaryonten zu Verfügung stehen, bei Ciliaten nur in wenigen Ausnahmefällen zu ausreichend hohen Transformationsraten führten (Gaertig, J., M. Goravsky (1992): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9196-9200). Außerdem standen bisher kaum geeignete Selektionsmarker für Transformationsversuche mit Ciliaten zu Verfügung,

da einige Markersysteme, die allgemein für Eukaryontentransformationen erfolgreich eingesetzt werden, sich bei Ciliaten offenbar nicht anwenden ließen (Wünning, I.U., Lipps, H.J. (1983): EMBO J.2, 1753-1757; Meyers, G., E. Helftenbein (1988): Gene 63, 31-40).

Ein Grund für die Schwierigkeiten, Ciliaten erfolgreich zu transformieren, liegt vermutlich darin, daß die Zellen von einer komplexen und stabilen Cortexstruktur umgeben sind.

Seit kurzem ist es bekannt, daß man Pflanzenzellen, die von einer festen und starren Zellwand umgeben sind, mit der Methode des Microcarrierbombardements sehr effektiv transformieren kann (Boynton, J.E., N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson, A.R. Jones, B.L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T.M. Klein, K.B. Shark, J.C. Sanford (1988): Science 240, 1534-1537; Klein, T.M., L. Kornstein, J.C. Sanford, M.E. Fromm (1989): Plant Physiol. 91, 440-444; Klein, T.M., E.D. Wolf, R. Wu, J.C. Sanford (1987): Nature 327, 70-73). Diese biolistische Methode ist mittlerweile optimiert worden (Sanford, J.C., F.D. Smith, J.A. Russell (1993): Meth. Enzymol. 217, 483-509) und wurde auch erfolgreich zur Transformation von Säugerzellen (Fitzpatrick-McElligott, S. (1992): Bio/Technology 10, 1036-1040) und Seeigeleiern (Akasaka, K., A. Nishimura, K. Hijikata, Y. Luchi, J. Morokuma, M. Takahashi, H. Morikawa, H. Shimada (1995): Molecular Marine Biology and Biotechnology 4(3), 255-261) eingesetzt. Die Besonderheit dieser Transformationsmethode erlaubt es sogar, intrazelluläre Kompartimente wie z.B. Chloroplasten oder Mitochondrien zu transformieren (Boynton, J.E., N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson, A.R. Jones, B.L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T.M. Klein, K.B. Shark, J.C. Sanford (1988): Science 240, 1534-1537; Johnston, S.A., P.Q. Anziano, K. Shark, J.C. Sanford, R.A. Butow (1988) Science 240, 1538-1541).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Expression einer heterologen DNA in einem neuen Expressionssystem bzw. Wirt bereitzustellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch die unabhängigen Ansprüche 1 und 17 und im besonderen durch die bevorzugten Ausgestaltungen der Unteransprüche 2 bis 16 und 18 bis 23.

Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Expression einer heterologen DNA in einem Expressionssystem, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionssystem transformierte Ciliatenzellen verwendet werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die heterologe DNA-Sequenz ein Gen ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz menschlichen Ursprungs ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA tierischen Ursprungs ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA pflanzlichen Ursprungs ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA bakteriellen Ursprungs ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA pilzlichen Ursprungs ist.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, bestehend unter anderem aus den Schritten:

- a) Herstellung eines Expressionsvektors, der die folgenden DNA-Teilsequenzen enthält:

- i) einen Promotor, der in Ciliaten aktiv ist und die Transkription der zu exprimierenden heterologen DNA bewirkt;
 - ii) die mit dem Promotor in sens-Orientierung verbundene zu exprimierende heterologe DNA;
 - iii) ein die Transkription beendendes Terminierungssignal, das in Ciliaten aktiv ist;
 - iv) wahlweise einen geeigneten ori (origin of replication = Ursprung der Replikation), der die Vermehrung des Vektors in der Wirtszelle bewirkt; und
- b) Transformation der Ciliatenzellen mit dem Expressionsvektor gemäß Schritt (a).

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen mittels der Methode des Microcarrier-Bombardement mit DNA beladenen Goldpartikeln transformiert werden.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation der Ciliatenzellen das Plasmid pRT103gus verwendet wird, welches die heterologe DNA enthält.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus, die kodierende Region der heterologen DNA und ein Polyadenylierungssignal enthält.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen ausgewählt sind aus der Gruppe Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia und Suctoria.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen

ausgewählt sind aus der Gruppe Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Colpoda, Glaucoma, Platyophrya, Vorticella, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionssystem Zellen der Ciliatenart Stylonychia lemnae verwendet werden.

15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die heterologe DNA in vitro modifiziert wurde.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Expressionsprodukt ein Protein ist.

17. Ciliat, erhältlich durch Transformation mit heterologer DNA.

18. Ciliat nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mittels der Methode des Microcarrier-Bombardement mit DNA beladenen Goldpartikeln durchgeführt wurde.

19. Ciliat nach Anspruch 17 oder 18, erhältlich durch die folgenden Verfahrensschritte:

- a) Herstellung eines Expressionsvektors, der die folgenden DNA-Teilsequenzen enthält:
 - i) einen Promotor, der in Ciliaten aktiv ist und die Transskription der zu exprimierenden heterologen DNA bewirkt;
 - ii) die mit dem Promotor in sens-Orientierung verbundene zu exprimierende heterologe DNA;
 - iii) ein die Transskription beendendes Terminierungssignal, das in Ciliaten aktiv ist;

- iv) wahlweise einen geeigneten ori (origin of replication = Ursprung der Replikation), der die Vermehrung des Vektors in der Wirtszelle bewirkt; und
- b) Transformation der Ciliatenzellen mit dem Expressionsvektor gemäß Schritt (a).

20. Ciliat nach einem oder mehreren der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er mit dem die heterologen DNA enthaltenden Plasmid pRT103gus transformiert wurde.

21. Ciliat nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid den 35-S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus, die kodierende Region der heterologen DNA und ein Polyadenylierungssignal enthält.

22. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor zusätzlich noch eine Signalsequenz enthält, welche zum Ausschleusen des Genprodukts aus der Zelle führt.

23. Ciliat nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor zusätzlich noch eine Signalsequenz enthält, welche zum Ausschleusen des Genprodukts aus der Zelle führt.

Mit dem nachfolgend beschriebenen Versuchsansatz wurde die Methode des Microcarrier-Bombardements mit DNA beladenen Goldpartikeln zum ersten Mal zur Transformation von Ciliatenzellen angewendet. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß mit dieser Methode, angewendet mit dem Heliumgas-betriebenen Gerät der Fa. Biorad, eine sehr einfache und effektive Transformation von Ciliatenzellen möglich ist. Der Versuch zeigt außerdem, daß das verwendete heterologe Gen nach der Transformation in den Ciliatenzellen zu einem funktionsfähigen Genprodukt exprimiert wurde. Damit bietet diese Methode die Möglichkeit, Ciliaten wirkungsvoll für biotechnologische Zwecke sowohl mit heterologen ("fremden") als auch mit ggf. gentechnisch veränderten homologen Genen zu transformieren. Daraus folgt, daß durch die Anwendung dieser Transformationstechnik die eingangs erwähnten,

vorteilhaften molekularbiologischen Besonderheiten der Ciliaten erstmals in größerem Maßstab für biotechnologische Anwendungen ausgenutzt werden können.

Beispiele:

1. **DNA-Präzipitation auf die Microcarrierpartikel**
Goldpartikel (1,6 µm Durchmesser) werden zu 40 mg/ml in Wasser suspendiert. Von der Partikelsuspension werden 25 µl mit 5 µl DNA-Lösung (Konz. 1 µg/µl in TE-Puffer), 25 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung, 20 µl 0,1 M Spermidinlösung unter Vortexen gemischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min werden die Partikel durch Zentrifugieren in der Minifuge (12 000 rpm) sedimentiert. 50 µl des Überstandes werden abgenommen und verworfen, der Rest wird resuspendiert. Davon werden 3 µl auf die Membran (rupture disk) für das Bombardement pipettiert.
2. **Verwendetes Markerplasmid**
Für die Transformation wurde das Plasmid pRT103gus benutzt. Es trägt eine Ampicillinresistenz, den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus, die codierende Region des β-Glucuronidase-Gens von E. coli und ein Polyadenylierungssignal und wird erfolgreich zur Transformation von Pflanzen eingesetzt.
3. **Transformation und verwendeter Organismus**
Die Transformation wurde mit dem BIOLISTIC Particle Delivery System (PDS-1 000/He) der Firma BIO-RAD durchgeführt.

Für die Transformationsexperimente wurden Zellen der Ciliatenart *Stylonychia lemnae* (Ciliate, Hypotrichida), Stamm Do-6/E benutzt. Die Zellen hatten vor dem Experiment einen Tag lang gehungert. Sie wurden auf Nylongaze mit 30 µm Maschenweite konzentriert und mit der geringstmöglichen Menge Kulturmedium (Pringsheim's Lösung) unmittelbar vor dem Versuch in eine Plastikpetrischale gespült. Die Schale mit den

konzentrierten Zellen wurde auf den Boden der Kammer des Transformationsgeräts gestellt. Das Bombardement erfolgte aus dem größtmöglichen Abstand, den das Gerät erlaubt. Es wurde ein Burst-Druck von 450 psi und die entsprechende "rupture disk" verwendet. Sofort nach dem Bombardement wurden die Zellen in Kulturmedium verdünnt und schwach mit Futterorganismen (*Chlorogonium elongatum*) angefüttert.

4. Nachweis der Glucuronidase-Aktivität

Als Substrat für die Glucuronidase werden 25 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-glucuronid in 4 ml DMSO und 40 ml 10 mM EDTA, 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0, 0,1 % Triton gelöst. Die transformierten Ciliatenzellen wurden zwei Tage nach dem Transformationsexperiment durch Filtration auf einem Filter gesammelt. Die Filter mit den Ciliatenzellen wurden in der Substratlösung bei 32°C inkubiert. Durch die Triton-haltige Lösung werden die Zellen partiell lysiert. Zellen, die das transformierte Glucuronidase-Gen exprimieren, sind nach kurzer Zeit an einer deutlichen Blaufärbung zu erkennen. Nicht-transformierte, aber ansonsten gleich behandelte Kontrollzellen zeigen auch nach mehrstündiger Inkubation keine Blaufärbung.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Expression einer heterologen DNA in einem Expressionssystem, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionssystem transformierte Ciliatenzellen verwendet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die heterologe DNA-Sequenz ein Gen ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz menschlichen Ursprungs ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA tierischen Ursprungs ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA pflanzlichen Ursprungs ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA bakteriellen Ursprungs ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA pilzlichen Ursprungs ist.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, bestehend unter anderem aus den Schritten:
 - a) Herstellung eines Expressionsvektors, der die folgenden DNA-Teilsequenzen enthält:
 - i) einen Promotor, der in Ciliaten aktiv ist und die Transkription der zu exprimierenden heterologen DNA bewirkt;

- ii) die mit dem Promotor in sens-Orientierung verbundene zu exprimierende heterologe DNA;
 - iii) ein die Transkription beendendes Terminierungssignal, das in Ciliaten aktiv ist;
 - (iv) wahlweise einen geeigneten ori (origin of replication = Ursprung der Replikation), der die Vermehrung des Vektors in der Wirtszelle bewirkt; und
 - b) Transformation der Ciliatenzellen mit dem Expressionsvektor gemäß Schritt (a).
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen mittels der Methode des Microcarrier-Bombardement mit DNA beladenen Goldpartikeln transformiert werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation der Ciliatenzellen das Plasmid pRT103gus verwendet wird, welches die heterologe DNA enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus, die kodierende Region der heterologen DNA und ein Polyadenylierungssignal enthält.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen ausgewählt sind aus der Gruppe Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia und Suctoria.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliatenzellen ausgewählt sind aus der Gruppe Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Colpoda, Glaucoma, Platyophrya, Vorticella, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionssystem Zellen der Ciliatenart *Stylonychia lemnae* verwendet werden.
15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die heterologe DNA in vitro modifiziert wurde.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Expressionsprodukt ein Protein ist.
17. Ciliat, erhältlich durch Transformation mit heterologer DNA.
18. Ciliat nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mittels der Methode des Microcarrier-Bombardement mit DNA beladenen Goldpartikeln durchgeführt wurde.
19. Ciliat nach Anspruch 17 oder 18, erhältlich durch die folgenden Verfahrensschritte:
 - a) Herstellung eines Expressionsvektors, der die folgenden DNA-Teilsequenzen enthält:
 - i) einen Promotor, der in Ciliaten aktiv ist und die Transskription der zu exprimierenden heterologen DNA bewirkt;
 - ii) die mit dem Promotor in sens-Orientierung verbundene zu exprimierende heterologe DNA;
 - iii) ein die Transskription beendendes Terminierungssignal, das in Ciliaten aktiv ist;
 - (iv) wahlweise einen geeigneten ori (origin of repliation = Ursprung der Replikation), der die Vermehrung des Vektors in der

Wirtszelle bewirkt; und

- b) Transformation der Ciliatenzellen mit dem Expressionsvektor gemäß Schritt (a).
20. Ciliat nach einem oder mehreren der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er mit dem die heterologen DNA enthaltenden Plasmid pRT103gus transformiert wurde.
21. Ciliat nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid den 35-S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus, die kodierende Region der heterologen DNA und ein Polyadenylierungssignal enthält.
22. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor zusätzlich noch eine Signalsequenz enthält, welche zum Ausschleusen des Genprodukts aus der Zelle führt.
23. Ciliat nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor zusätzlich noch eine Signalsequenz enthält, welche zum Ausschleusen des Genprodukts aus der Zelle führt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 97/03472

A. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/79 C12N15/87 C12N1/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAHN R. ET AL.: "Transformation of Tetrahymena thermophila by microinjection of a foreign gene" PNAS, U.S.A., vol. 90, no. 20, 15 October 1993, pages 9295-9299, XP002044342 see the whole document	1,2,6,8, 12,13, 15-17,19
X	HAYNES W. ET AL.: "Induction of antibiotic resistance in Paramecium tetraurelia by the bacterial gene APH-3'-II" JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY, vol. 42, no. 1, 1995, pages 83-91, XP002044343 see the whole document --- -/--	1,2,6,8, 13, 15-17,19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 1997

Date of mailing of the international search report

31. 10. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/EP 97/03472

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEYERS G. AND HELFTENBEIN E.: "Transfection of the hypotrichous ciliate Stylonychia lemnae with linear DNA vectors" GENE, vol. 63, no. 1, 1988, pages 31-40, XP002044344 cited in the application see the whole document	1,2,6,8, 12-17,19
A	--- YAO M. AND YAO C.: "Transformation of Tetrahymena to cycloheximide resistance with a ribosomal protein gene through sequence replacement" PNAS,U.S.A., vol. 88, no. 21, 1 November 1991, pages 9493-9497, XP002044345 see the whole document	1-23
A	--- GAERTIG J. AND GOROVSKY M.: "Efficient mass transformation of Tetrahymena thermophila by electroporation of conjugates" PNAS,U.S.A., vol. 89, no. 19, 1 October 1992, pages 9196-9200, XP002044346 cited in the application see the whole document	1-23
A	--- US 5 179 022 A (SANFORD JOHN C ET AL) 12 January 1993 see the whole document	9-16, 18-21,23
T	--- CASSIDY-HANLEY D. ET AL.: "Germline and somatic transformation of mating tetrahymena thermophila by particle bombardement" GENETICS, vol. 146, no. 1, May 1997, pages 135-147, XP002044347 see the whole document	1-23
T	--- HAI B. AND GOROVSKY M.: "Germ-line knockout heterokaryons of an essential alpha-tubulin gene enable high-frequency gene replacement and a test of gene transfer from somatic to germ-line nuclei in Tetrahymena thermophila" PNAS,U.S.A., vol. 94, no. 4, 18 February 1997, pages 1310-1315, XP002044348 see the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No

PCT/EP 97/03472

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5179022 A	12-01-93	AT 119569 T	15-03-95
		AU 2374388 A	31-08-89
		CN 1036511 A,B	25-10-89
		DE 3853278 D	13-04-95
		DE 3853278 T	13-07-95
		EP 0331855 A	13-09-89
		JP 1227764 A	11-09-89
		JP 2559479 B	04-12-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. als Aktenzeichen

PCT/EP 97/03472

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/79 C12N15/87 C12N1/11

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KAHN R. ET AL.: "Transformation of Tetrahymena thermophila by microinjection of a foreign gene" PNAS, U.S.A., Bd. 90, Nr. 20, 15. Oktober 1993, Seiten 9295-9299, XP002044342 siehe das ganze Dokument ---	1,2,6,8, 12,13, 15-17,19
X	HAYNES W. ET AL.: "Induction of antibiotic resistance in Paramecium tetraurelia by the bacterial gene APH-3'-II" JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY, Bd. 42, Nr. 1, 1995, Seiten 83-91, XP002044343 siehe das ganze Dokument ---	1,2,6,8, 13, 15-17,19
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Oktober 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31. 10. 97

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MEYERS G. AND HELFTENBEIN E.: "Transfection of the hypotrichous ciliate Stylonychia lemnae with linear DNA vectors" GENE, Bd. 63, Nr. 1, 1988, Seiten 31-40, XP002044344 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,6,8, 12-17,19
A	YAO M. AND YAO C.: "Transformation of Tetrahymena to cycloheximide resistance with a ribosomal protein gene through sequence replacement" PNAS, U.S.A., Bd. 88, Nr. 21, 1. November 1991, Seiten 9493-9497, XP002044345 siehe das ganze Dokument ---	1-23
A	GAERTIG J. AND GOROVSKY M.: "Efficient mass transformation of Tetrahymena thermophila by electroporation of conjugates" PNAS, U.S.A., Bd. 89, Nr. 19, 1. Oktober 1992, Seiten 9196-9200, XP002044346 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-23
A	US 5 179 022 A (SANFORD JOHN C ET AL) 12. Januar 1993 siehe das ganze Dokument ---	9-16, 18-21,23
T	CASSIDY-HANLEY D. ET AL.: "Germline and somatic transformation of mating tetrahymena thermophila by particle bombardement" GENETICS, Bd. 146, Nr. 1, Mai 1997, Seiten 135-147, XP002044347 siehe das ganze Dokument ---	1-23
T	HAI B. AND GOROVSKY M.: "Germ-line knockout heterokaryons of an essential alpha-tubulin gene enable high-frequency gene replacement and a test of gene transfer from somatic to germ-line nuclei in Tetrahymena thermophila" PNAS, U.S.A., Bd. 94, Nr. 4, 18. Februar 1997, Seiten 1310-1315, XP002044348 siehe das ganze Dokument -----	1-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: les Aktenzeichen

PCT/EP 97/03472

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5179022 A	12-01-93	AT 119569 T	15-03-95
		AU 2374388 A	31-08-89
		CN 1036511 A,B	25-10-89
		DE 3853278 D	13-04-95
		DE 3853278 T	13-07-95
		EP 0331855 A	13-09-89
		JP 1227764 A	11-09-89
		JP 2559479 B	04-12-96
